

541,702

10/541702

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2004 年 7 月 29 日 (29.07.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/063167 A1

(51) 国際特許分類: C07D 231/26, A61K 31/4152, A61P 7/00, 9/00, 25/00, 29/00, 35/00, 43/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/000105

(22) 国際出願日: 2004 年 1 月 9 日 (09.01.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2003-004813 2003 年 1 月 10 日 (10.01.2003) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 三菱ウェルファーマ株式会社 (MITSUBISHI PHARMA CORPORATION) [JP/JP]; 〒5410046 大阪府大阪市中央区平野町 2 丁目 6 番 9 号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 川上 純一 (KAWAKAMI, Junichi) [JP/JP]; 〒9390364 富山県射水郡小杉町南太閤山 2-2 医薬大宿舎 5-202 Toyama (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス (SIKS &amp; CO.); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目 8 番 7 号 京橋日殖ビル 8 階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

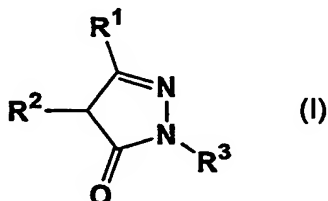
(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: BLOOD-BRAIN BARRIER DISRUPTION INHIBITORS

(54) 発明の名称: 血液脳関門破壊抑制剤



(57) Abstract: The invention aims at providing blood-brain barrier disruption inhibitors. The invention provides blood-brain barrier disruption inhibitors containing as the active ingredient pyrazolone derivatives represented by the general formula (I), physiologically acceptable salts thereof, or hydrates or solvates of the same: (I) wherein R<sup>1</sup> is hydrogen, aryl, alkyl, or alkoxycarbonylalkyl, and R<sup>2</sup> is hydrogen, aryloxy, arylmercapto, alkyl, or hydroxyalkyl, or R<sup>1</sup> and R<sup>2</sup> may be united to form alkylene; and R<sup>3</sup> is hydrogen, alkyl, cycloalkyl, hydroxyalkyl, benzyl, naphthyl, phenyl, or phenyl which is mono- to tri-substituted with one or more members selected from the group consisting of alkyl, alkoxy, hydroxyalkyl, alkoxycarbonyl, alkylmercapto, alkylamino, dialkylamino, halogeno, trifluoromethyl, carboxyl, cyano, hydroxyl, nitro, amino, and acetamido.

[続葉有]

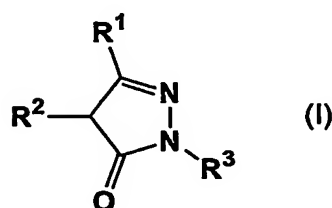
BEST AVAILABLE COPY

WO 2004/063167 A1



## (57) 要約:

本発明の目的は、血液脳関門破綻抑制剤を提供することである。本発明によれば、下記式 (I) :



(式中、R<sup>1</sup>は、水素原子、アリール基、アルキル基又はアルコキシカルボニルアルキル基を表し；R<sup>2</sup>は、水素原子、アリールオキシ基、アリールメルカプト基、アルキル基又はヒドロキシアルキル基を表し；あるいは、R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>は、共同してアルキレン基を表し；R<sup>3</sup>は、水素原子、アルキル基、シクロアルキル基、ヒドロキシアルキル基、ベンジル基、ナフチル基、フェニル基、又はアルキル基、アルコキシ基、ヒドロキシアルキル基、アルコキシカルボニル基、アルキルメルカプト基、アルキルアミノ基、ジアルキルアミノ基、ハロゲン原子、トリフルオロメチル基、カルボキシル基、シアノ基、水酸基、ニトロ基、アミノ基及びアセトアミド基からなる群から選ばれる1～3個の置換基で置換されたフェニル基を表す。)で示されるピラゾロン誘導体若しくはその生理学的に許容される塩、又はそれらの水和物若しくは溶媒和物を有効成分として含む、血液脳関門破綻抑制剤が提供される。

## 明細書

### 血液脳関門破綻抑制剤

#### 技術分野

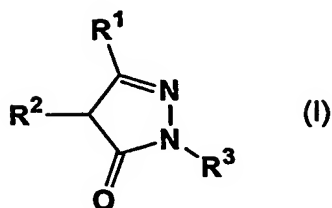
本発明は、ピラゾロン誘導体若しくはその生理学的に許容される塩、又はそれらの水和物若しくは溶媒和物を有効成分として含む血液脳関門破綻抑制剤に関する。

#### 背景技術

血液脳関門 (blood-brain barrier) とは、血液から脳組織内への物質の移行を制限する関門であり、これにより脳は有害物質から保護されている。ニコチン、カフェイン又はヘロインなどの脂溶性物質は血液脳関門を容易に通過できるが、極性物質又は強電解質などの非脂溶性物質は一般に血液脳関門を通過しにくい。一方、脳の代謝に必要なD-グルコース等の水溶性物質はキャリアーによって血液脳関門を透過して脳組織へ運ばれることが知られている。脳毛細血管においては、隣接する内皮細胞同士がタイト・ジャンクションと呼ばれる緊密な結合を形成し、細胞間の隙間から漏出しないようになっており、そのため、脳内に入り出す物質は原則として脳毛細血管内皮細胞を通過しなくてはならないとされている。上記のように、脳毛細血管内皮細胞は、脳への栄養物質だけでなく細胞膜に発現している種々の輸送系によって薬物を脳内へ輸送する。

多発性硬化症、髄膜炎、脳炎または脳膿瘍などの中枢神経系の炎症性疾患では血液脳関門が破綻しており、髄液中に存在する炎症性サイトカインであるTNF- $\alpha$ やIL-1 $\beta$ が高値を示すことが報告されている (S.L. Hauser, et al., Cytokine accumulation in CSF of multiple sclerosis patients: frequent detection of interleukin-1 and tumor necrosis factor but not interleukin-6. Neurology, 40: 1735-1739 (1990))。

一方、下記式 (I) :



(式中、R<sup>1</sup>は水素原子、アリール、炭素数1～5のアルキル又は総炭素数3～6のアルコキシカルボニルアルキルを表し、R<sup>2</sup>は、水素原子、アリールオキシ、アリールメルカプト、炭素数1～5のアルキル又は炭素数1～3のヒドロキシアルキルを表し、あるいは、R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>は、共同して炭素数3～5のアルキレンを表し、R<sup>3</sup>は水素原子、炭素数1～5のアルキル、炭素数5～7のシクロアルキル、炭素数1～3のヒドロキシアルキル、ベンジル、ナフチル又はフェニル、又は炭素数1～5のアルコキシ、炭素数1～3のヒドロキシアルキル、総炭素数2～5のアルコキシカルボニル、炭素数1～3のアルキルメルカプト、炭素数1～4のアルキルアミノ、総炭素数2～8のジアルキルアミノ、ハロゲン原子、トリフルオロメチル、カルボキシル、シアノ、水酸基、ニトロ、アミノ、及びアセトアミドからなる群から選ばれる同一若しくは異なる1～3個の置換基で置換されたフェニルを表す。)で表されるピラゾロン誘導体については、医薬の用途として、脳機能正常化作用(特公平5-31523号公報を参照)、過酸化脂質生成抑制作用(特公平5-35128号公報を参照)、抗潰瘍作用(特開平3-215425号公報を参照)、及び血糖上昇抑制作用(特開平3-215426号公報を参照)等が知られている。

また、上記式(I)の化合物のうち、3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オンを有効成分とする製剤は、2001年6月以来、脳保護剤(一般名「エダラボン」、商品名「ラジカット」:三菱ウェルファーマ株式会社製造・販売)として上市されている。この「エダラボン」は、活性酸素に対して高い反応性を有することが報告されている(Kawai, H., et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 281(2), 921, 1997、及びWu, TW. et al., Life Sci, 67(19), 2387, 2000を参照)。このように、エダラボンは活性酸素をはじめとする種々のフリーラジカルを消去することで、細胞障害などを防ぐ働きをするフリーラジカルスカベンジャー

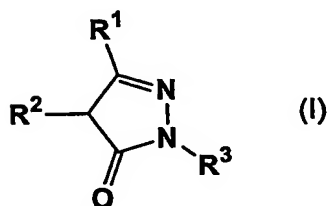
である。しかしながら、これまでエダラボンが血液脳関門の破綻を抑制できるか否かの検討については全く報告がない。

#### 発明の開示

本発明の課題は、血液脳関門破綻抑制剤を提供することにある。

本発明者らは、上記課題を解決することを目的として、インピトロおよびインピボの系を用いて、式（I）で示されるピラズロン誘導体が血液脳関門破綻を抑制する効果について検討した。その結果、上記ピラズロン誘導体の投与により、血液脳関門の破綻を抑制し、中枢神経系の炎症性疾患の患者の神経症状を緩和できることを見出し、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明によれば、下記式（I）：



（式中、 $R^1$ は、水素原子、アリール基、炭素数1～5のアルキル基又は総炭素数3～6のアルコキシカルボニルアルキル基を表し； $R^2$ は、水素原子、アリールオキシ基、アリールメルカプト基、炭素数1～5のアルキル基又は炭素数1～3のヒドロキシアルキル基を表し；あるいは、 $R^1$ 及び $R^2$ は、共同して炭素数3～5のアルキレン基を表し； $R^3$ は、水素原子、炭素数1～5のアルキル基、炭素数5～7のシクロアルキル基、炭素数1～3のヒドロキシアルキル基、ベンジル基、ナフチル基、フェニル基、又は炭素数1～5のアルキル基、炭素数1～5のアルコキシ基、炭素数1～3のヒドロキシアルキル基、総炭素数2～5のアルコキシカルボニル基、炭素数1～3のアルキルメルカプト基、炭素数1～4のアルキルアミノ基、総炭素数2～8のジアルキルアミノ基、ハロゲン原子、トリフルオロメチル基、カルボキシル基、シアノ基、水酸基、ニトロ基、アミノ基及びアセトアミド基からなる群から選ばれる同一若しくは異なる1～3個の置換基で置換されたフェニル基を表す。）

で示されるピラゾロン誘導体若しくはその生理学的に許容される塩、又はそれらの水和物若しくは溶媒和物を有効成分として含む、血液脳関門破綻抑制剤が提供される。

本発明の好ましい態様によれば、血液脳関門の透過性の増大を抑制する作用を有する血液脳関門破綻抑制剤、並びに、髄液中における炎症性サイトカインの量の増大を抑制する作用を有する血液脳関門破綻抑制剤が提供される。

本発明の好ましい態様によれば、式（I）で示されるピラゾロン誘導体は3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オン若しくはその生理学的に許容される塩、又はそれらの水和物若しくは溶媒和物である。

本発明の別の側面によれば、上記式（I）で示されるピラゾロン誘導体若しくはその生理学的に許容される塩、又はそれらの水和物若しくは溶媒和物を有効成分として含む、多発性硬化症、髄膜炎、脳炎又は脳膿瘍の予防及び／又は治療のための医薬が提供される。好ましい態様によれば、式（I）で示されるピラゾロン誘導体は3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オンである。

本発明のさらに別の局面によれば、上記式（I）で示されるピラゾロン誘導体若しくはその生理学的に許容される塩、又はそれらの水和物若しくは溶媒和物の有効量をヒトを含む哺乳動物に投与する工程を含む、血液脳関門破綻を抑制する方法；並びに、上記式（I）で示されるピラゾロン誘導体若しくはその生理学的に許容される塩、又はそれらの水和物若しくは溶媒和物の有効量をヒトを含む哺乳動物に投与する工程を含む、多発性硬化症、髄膜炎、脳炎又は脳膿瘍を予防及び／又は治療する方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、血液脳関門破綻抑制剤の製造のための式（I）で示されるピラゾロン誘導体若しくはその生理学的に許容される塩、又はそれらの水和物若しくは溶媒和物の使用；並びに、多発性硬化症、髄膜炎、脳炎又は脳膿瘍の予防及び／又は治療のための医薬の製造のための式（I）で示されるピラゾロン誘導体若しくはその生理学的に許容される塩、又はそれらの水和物若しくは溶媒和物の使用が提供される。

## 図面の簡単な説明

図1は、血液脳関門共培養モデルの概要（左の図）、並びに、作製した共培養モデルにおけるフルオレッセインナトリウム拡散速度とTEER（Transcellar endothelial electrical resistance）との相関（右の図）を示す。図1において、PSendoは内皮細胞層におけるフルオレセインの透過クリアランスを示す。トランスウエルのapical側（内皮細胞の側）のメディウム中にフルオレセインを添加して、basolateral側（アストロサイトの側）のメディウムへのフルオレセインの透過を観測している。一定時間までにbasolateral側に透過したフルオレセイン量を、apical側メディウム中フルオレセイン濃度で割った値である。実験上は内皮細胞層＋トランスウエルのフィルター＋アストロサイトの各層を合わせたトータルの透過クリアランス（PStotal）が測定されるため、トランスウエルのフィルターにアストロサイトだけを培養した場合の透過クリアランス（PSastro+filter）も同時に用いて補正している。補正式： $1/PStotal = 1/PSendo + 1/PSastro+filter$ 。

図2は、TEERに対するTNF $\alpha$ （tumor necrosis factor  $\alpha$ ）およびIL1 $\beta$ （interleukin-1  $\beta$ ）の影響を調べた結果を示す。

図3は、TEERに対するNF- $\kappa$ B（nuclear factor- $\kappa$ B）阻害薬およびiNOS（inducible nitric oxide synthase）阻害薬の効果を示す。 $\alpha$ -MSHは $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormoneを示す。

図4は、NO産生量に対するNF- $\kappa$ B阻害薬およびiNOS阻害薬の効果を示す。

図5は、TEERに対するエダラボンの効果を示す。

図6は、EAEラットにおけるTNF $\alpha$ とIL-1 $\beta$ の量並びにBBB透過性を調べた結果を示す。

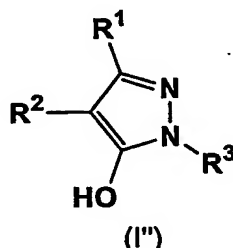
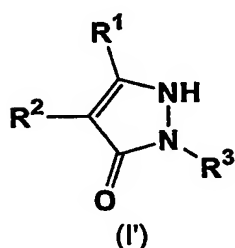
図7は、EAEラットにおけるTNF $\alpha$ とIL-1 $\beta$ の量並びにBBB透過性に対するエダラボンの効果を示す。CSFは脳脊髄液を示す。

図8は、EAEモデルラットにおいて薬剤を投与しない群（コントロール）、デキサメタゾンを投与した群、及びエダラボンを投与した群について、肢神経麻痺スコアを評価した結果を示す。i. p. は腹腔内投与を示す。

### 発明を実施するための最良の形態

本発明による血液脳関門破綻抑制剤、並びに多発性硬化症、髄膜炎、脳炎又は脳膿瘍の予防及び／又は治療のための医薬（以下、本発明の薬剤とも称する）は、本明細書に定義する式（I）で示されるピラゾロン誘導体若しくはその生理学的に許容される塩、又はそれらの水和物若しくは溶媒和物を含む。

本発明で用いる式（I）で示される化合物は、互変異性により、以下の式（I'）又は（I''）で示される構造をもとりうる。本明細書の式（I）には、便宜上、互変異性体のうちの1つを示したが、当業者には下記の互変異性体の存在は自明である。本発明の医薬の有効成分としては、下記の式（I'）又は（I''）で表される化合物若しくはその生理学的に許容される塩、又はそれらの水和物若しくは溶媒和物を用いてもよい。



式（I）において、 $R^1$ の定義におけるアリール基は単環性又は多環性アリール基のいずれでもよい。例えば、フェニル基、ナフチル基などのほか、メチル基、ブチル基などのアルキル基、メトキシ基、ブトキシ基などのアルコキシ基、塩素原子などのハロゲン原子、又は水酸基等の置換基で置換されたフェニル基等が挙げられる。アリール部分を有する他の置換基（アリールオキシ基など）におけるアリール部分についても同様である。

$R^1$ 、 $R^2$ 及び $R^3$ の定義における炭素数1～5のアルキル基は直鎖状、分枝鎖状のいずれでもよい。例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、イソブチル基、sec-ブチル基、tert-ブチル基、ペンチル基等が挙げられる。アルキル部分を有する他の置換基（アルコキシカルボニルアルキル基）におけるアルキル部分についても同様である。



$R^1$ の定義における総炭素数3~6のアルコキシカルボニルアルキル基としては、メトキシカルボニルメチル基、エトキシカルボニルメチル基、プロポキシカルボニルメチル基、メトキシカルボニルエチル基、メトキシカルボニルプロピル基等が挙げられる。

$R^2$ の定義におけるアリールオキシ基としては、p-メチルフェノキシ基、p-メトキシフェノキシ基、p-クロロフェノキシ基、p-ヒドロキシフェノキシ基等が挙げられ、アリールメルカプト基としては、フェニルメルカプト基、p-メチルフェニルメルカプト基、p-メトキシフェニルメルカプト基、p-クロロフェニルメルカプト基、p-ヒドロキシフェニルメルカプト基等が挙げられる。

$R^1$ 及び $R^2$ の定義における炭素数3~5のアルキレン基としては、トリメチレン基、テトラメチレン基、ペンタメチレン基、ヘキサメチレン基、メチルトリメチレン基、エチルトリメチレン基、ジメチルトリメチレン基、メチルテトラメチレン基等が挙げられる。

$R^2$ 及び $R^3$ の定義における炭素数1~3のヒドロキシアルキル基としては、ヒドロキシメチル基、2-ヒドロキシエチル基、3-ヒドロキシプロピル基等が挙げられる。 $R^3$ の定義における炭素数5~7のシクロアルキル基としては、シクロペンチル基、シクロヘキシル基、シクロヘプチル基等が挙げられる。

$R^3$ の定義において、フェニル基の置換基における炭素数1~5のアルコキシ基としては、メトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、イソプロポキシ基、ブトキシ基、ペンチルオキシ基等が挙げられ、総炭素数2~5のアルコキシカルボニル基としては、メトキシカルボニル基、エトキシカルボニル基、プロポキシカルボニル基、ブトキシカルボニル基等が挙げられ、炭素数1~3のアルキルメルカプト基としては、メチルメルカプト基、エチルメルカプト基、プロピルメルカプト基等が挙げられ、炭素数1~4のアルキルアミノ基としては、メチルアミノ基、エチルアミノ基、プロピルアミノ基、ブチルアミノ基等が挙げられ、総炭素数2~8のジアルキルアミノ基としては、ジメチルアミノ基、ジエチルアミノ基、ジプロピルアミノ基、ジブチルアミノ基等が挙げられる。

本発明の薬剤の有効成分として好適に用いられる化合物(I)として、例えば、

以下に示す化合物が挙げられる。

- 3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オン；
- 3-メチル-1-(2-メチルフェニル)-2-ピラゾリン-5-オン；
- 3-メチル-1-(3-メチルフェニル)-2-ピラゾリン-5-オン；
- 3-メチル-1-(4-メチルフェニル)-2-ピラゾリン-5-オン；
- 3-メチル-1-(3,4-ジメチルフェニル)-2-ピラゾリン-5-オン；
- 1-(4-エチルフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン；
- 3-メチル-1-(4-プロピルフェニル)-2-ピラゾリン-5-オン；
- 1-(4-ブチルフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン；
- 1-(3-トリフルオロメチルフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン；
- 1-(4-トリフルオロメチルフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン；
- 1-(2-メトキシフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン；
- 1-(3-メトキシフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン；
- 1-(4-メトキシフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン；
- 1-(3,4-ジメトキシフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン；
- 1-(4-エトキシフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン；
- 3-メチル-1-(4-プロポキシフェニル)-2-ピラゾリン-5-オン；
- 1-(4-ブトキシフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン；
- 1-(2-クロロフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン；
- 1-(3-クロロフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン；
- 1-(4-クロロフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン；
- 1-(3,4-ジクロロフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン；
- 1-(4-ブロモフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン；
- 1-(4-フルオロフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン；
- 1-(3-クロロ-4-メチルフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-

－オン；

1－（3－メチルメルカプトフェニル）－3－メチル－2－ピラゾリン－5－オン；

1－（4－メチルメルカプトフェニル）－3－メチル－2－ピラゾリン－5－オン；

4－（3－メチル－5－オキソ－2－ピラゾリン－1－イル）安息香酸；

1－（4－エトキシカルボニルフェニル）－3－メチル－2－ピラゾリン－5－オン；

1－（4－ニトロフェニル）－3－メチル－2－ピラゾリン－5－オン；

3－エチル－1－フェニル－2－ピラゾリン－5－オン；

1－フェニル－3－プロピル－2－ピラゾリン－5－オン；

1, 3－ジフェニル－2－ピラゾリン－5－オン；

3－フェニル－1－（p－トリル）－2－ピラゾリン－5－オン；

1－（4－メトキシフェニル）－3－フェニル－2－ピラゾリン－5－オン；

1－（4－クロロフェニル）－3－フェニル－2－ピラゾリン－5－オン；

3, 4－ジメチル－1－フェニル－2－ピラゾリン－5－オン；

4－イソブチル－3－メチル－1－フェニル－2－ピラゾリン－5－オン；

4－（2－ヒドロキシエチル）－3－メチル－1－フェニル－2－ピラゾリン－5－オン；

3－メチル－4－フェノキシ－1－フェニル－2－ピラゾリン－5－オン；

3－メチル－4－フェニルメルカプト－1－フェニル－2－ピラゾリン－5－オン；

3, 3', 4, 5, 6, 7－ヘキサヒドロ－2－フェニル－2H－インダゾール－3－オン；

3－（エトキシカルボニルメチル）－1－フェニル－2－ピラゾリン－5－オン；

1－フェニル－2－ピラゾリン－5－オン；

3－メチル－2－ピラゾリン－5－オン；

- 1, 3-ジメチル-2-ピラゾリン-5-オン ;
- 1-エチル-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン ;
- 1-ブチル-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン ;
- 1-(2-ヒドロキエチル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン ;
- 1-シクロヘキシル-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン ;
- 1-ベンジル-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン ;
- 1-( $\alpha$ -ナフチル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン ;
- 1-メチル-3-フェニル-2-ピラゾリン-5-オン ;
- 3-メチル-1-(4-メチルフェニル)-2-ピラゾリン-5-オン ;
- 1-(4-ブチルフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン ;
- 1-(4-メトキシフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン ;
- 1-(4-ブトキシフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン ;
- 1-(4-クロロフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン ;
- 1-(4-ヒドロキシフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン ;
- 1-(3, 4-ジヒドロキシフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン ;
- 1-(2-ヒドロキシフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン ;
- 1-(3-ヒドロキシフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン ;
- 1-(4-ヒドロキシフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン ;
- 1-(3, 4-ヒドロキシフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン ;
- 1-(4-ヒドロキシフェニル)-3-フェニル-2-ピラゾリン-5-オン ;
- 1-(4-ヒドロキシメチルフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン ;
- 1-(4-アミノフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン ;
- 1-(4-メチルアミノフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン ;
- 1-(4-エチルアミノフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン ;
- 1-(4-ブチルアミノフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン ;

1- (4-ジメチルアミノフェニル) - 3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン ;

1- (アセトアミドフェニル) - 3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン ; 及び

1- (4-シアノフェニル) - 3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

本発明の薬剤の有効成分としては、式 (I) で表される遊離形態の化合物のほか、生理学的に許容される塩を用いてもよい。生理学的に許容される塩としては、塩酸、硫酸、臭化水素塩、リン酸等の鉱酸との塩 ; メタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、酢酸、グリコール酸、グルクロン酸、マレイン酸、フマル酸、シュウ酸、アスコルビン酸、クエン酸、サリチル酸、ニコチン酸、酒石酸等の有機酸との塩 ; ナトリウム、カリウム等のアルカリ金属との塩 ; マグネシウム、カルシウム等のアルカリ土類金属との塩 ; アンモニア、トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン、N, N-ビス (ヒドロキシエチル) ピペラジン、2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール、エタノールアミン、N-メチルグルタミン、L-グルタミン等のアミンとの塩が挙げられる。また、グリシンなどのアミノ酸との塩を用いてもよい。

本発明の薬剤の有効成分としては、上記式 (I) で表される化合物若しくはその生理学的に許容される塩の水和物、又は上記式 (I) で表される化合物若しくはその生理学的に許容される塩の溶媒和物を用いてもよい。溶媒和物を形成する有機溶媒の種類は特に限定されないが、例えば、メタノール、エタノール、エーテル、ジオキサン、テトラヒドロフランなどを例示することができる。また、上記式 (I) で表される化合物は、置換基の種類により1以上の不斉炭素を有する場合があり、光学異性体又はジアステレオ異性体などの立体異性体が存在する場合がある。本発明の医薬の有効成分としては、純粋な形態の立体異性体、立体異性体の任意の混合物、ラセミ体などを用いてもよい。

式 (I) で表される化合物はいずれも公知の化合物であり、特公平5-31523号公報などに記載された方法により当業者が容易に合成できる。

本発明の薬剤の投与量は特に限定されないが、通常は、有効成分である式 (I)

で示される化合物の重量として一般に経口投与の場合には一日あたり 0.1～1000mg/kg 体重、好ましくは一日あたり 0.5～50mg/kg 体重、であり、非経口投与の場合には一日あたり 0.01～100mg/kg 体重、好ましくは 0.1～10mg/kg 体重である。上記投与量は 1 日 1 回又は 2～3 回に分けて投与するのが好ましく、年齢、病態、症状により適宜増減してもよい。

本発明の薬剤としては、上記式 (I) で表される化合物若しくはその生理学的に許容される塩、又はそれらの水和物若しくは溶媒和物をそのまま投与してもよいが、一般的には、有効成分である上記の物質と薬理学的及び製剤学的に許容される添加物を含む医薬組成物を調製して投与することが好ましい。

薬理学的及び製剤学的に許容しうる添加物としては、例えば、賦形剤、崩壊剤ないし崩壊補助剤、結合剤、滑沢剤、コーティング剤、色素、希釈剤、基剤、溶解剤ないし溶解補助剤、等張化剤、pH 調節剤、安定化剤、噴射剤、及び粘着剤等を用いることができる。

経口投与に適する医薬組成物には、添加物として、例えば、ブドウ糖、乳糖、D-マンニトール、デンプン、又は結晶セルロース等の賦形剤；カルボキシメチルセルロース、デンプン、又はカルボキシメチルセルロースカルシウム等の崩壊剤又は崩壊補助剤；ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、又はゼラチン等の結合剤；ステアリン酸マグネシウム又はタルク等の滑沢剤；ヒドロキシプロピルメチルセルロース、白糖、ポリエチレングリコール又は酸化チタン等のコーティング剤；ワセリン、流動パラフィン、ポリエチレングリコール、ゼラチン、カオリン、グリセリン、精製水、又はハードファット等の基剤を用いることができる。

注射あるいは点滴用に適する医薬組成物には、注射用蒸留水、生理食塩水、プロピレングリコール等の水性あるいは用時溶解型注射剤を構成しうる溶解剤又は溶解補助剤；ブドウ糖、塩化ナトリウム、D-マンニトール、グリセリン等の等張化剤；無機酸、有機酸、無機塩基又は有機塩基等の pH 調節剤等の添加物を用いることができる。

本発明の薬剤の形態は特に限定されず、当業者に利用可能な種々の形態をとる

ことができる。経口投与に適する薬剤として、例えば、固体の製剤用添加物を用いて錠剤、散剤、顆粒剤、硬ゼラチンカプセル剤、坐剤、又はトローチ剤などを調製することができ、液状の製剤用添加物を用いてシロップ剤、乳剤、軟ゼラチンカプセル剤などを調製することができる。また、非経口投与に適する医薬として、注射剤、点滴剤、吸入剤、坐剤、経皮吸収剤、経粘膜吸収剤などを調製することができる。なお、上記の式 (I) の化合物を有効成分とする脳保護剤 (点滴剤) が、すでに臨床において使用されているので (一般名「エダラボン」、商品名「ラジカット」: 三菱ウェルファーマ株式会社製造・販売)、本発明の医薬において上記市販製剤をそのまま用いることができる。

本発明の薬剤は、中枢神経系の炎症性疾患における血液脳関門の破綻を抑制するのに有効である。中枢神経系の炎症性疾患としては、多発性硬化症、髄膜炎、脳炎および脳膿瘍などが挙げられ、特に好ましくは多発性硬化症および髄膜炎である。本発明の薬剤は好ましくは、血液脳関門の透過性の増大を抑制する作用、並びに髄液中における炎症性サイトカイン ( $\text{TNF-}\alpha$  または  $\text{IL-1}\beta$  等) の量の増大を抑制する作用を発揮することができる。

本発明の薬剤の投与経路は特に限定されず、経口的又は非経口的に投与することができる。非経口投与の投与経路も特に限定されず、静脈内、筋肉内、皮内、皮下に注射投与することができる。

また、本発明の薬剤は、血液脳関門の破綻に先立って予防的に投与しておくことができる。また、血液脳関門の破綻を起こした患者に対しては、症状の悪化の防止ないしは症状の軽減などを目的として、本発明の薬剤を該患者に投与することができる。

## 実施例

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明は下記の実施例により限定されるものではない。

合成例: 3-メチルー1-フェニルー2-ピラゾリン-5-オン (以下、エダラボンと称す) の合成

エタノール50ml中にアセト酢酸エチル13.0g及びフェニルヒドラジン10.8gを加え、3時間還流攪拌した。反応液を放冷後、析出した結晶をろ取り、エタノールより再結晶して、表題の化合物11.3gを無色結晶として得た。

収率 67%

融点 127.5~128.5℃

実施例1：血液脳関門共培養モデルを用いたエダラボンの血液脳関門破綻抑制作用の評価

#### (1) 血液脳関門共培養モデルの作製

血液脳関門共培養モデルは既報の方法で作製した (Eur. J. Pharm. Sci., 12:215-222, 2001)。具体的には、脳微小毛細血管内皮細胞とラットアストロサイトを単離し、Transwell TM フィルターの両面に培養させて共培養モデルを作製した。以下、その方法を説明する。

脳毛細血管をウシ脳から単離した。髄膜および白質を除去し、灰白質を10%胎児ウシ血清を添加したDMEM (DMEM+S) に回収した。血管断片をWheaton ホモジナイザーを用いて手動ホモジナイズにより調製し、150μmのナイロンメッシュ上に捕捉した。血管を、DMEM+S中においてコラゲナーゼ、トリプシン及びDNase Iで37℃で1時間消化し、200μmのナイロンメッシュで濾過した。脳毛細血管画分は、凍結混合物 (10%DMSOを含む胎児ウシ血清 (FCS)) 中に再懸濁し、-80℃で保存した。

アストロサイトは新生 Wister ラット (Harlan, Zeist, The Netherlands) から単離した。単離した皮質を断片化し、DMEM中トリプシン-EDTAとともに37℃でインキュベートした。懸濁物を120及び45μmのナイロンメッシュでそれぞれ濾過し、プラスチック組織培養フラスコ (Greiner, Alphen a/d Rijn, The Netherlands) 中でDMEM+S中で37℃10%CO<sub>2</sub>下で3日間培養した。その後、培地は2日毎に交換した。コンフルエントの時点で、培養物は1:3の分割比でポリ-D-リジン被覆フラスコにトリプシン-EDTAを用いて継代し、再度コンフルエントまで生育させた。次いで、アストロサイト馴化培地を1日お



きに2週間回収し、液体窒素中にて凍結混合物中に保存した。

脳毛細血管を、I V型コラーゲン及びフィブロネクチンを被覆したプラスチック組織培養フラスコに播種し、4時間接着させた。その後、培地を増殖培地（50%（v/v）アストロサイト馴化培地および125  $\mu$ g/mlヘパリンを加えたDMEM+S）に交換し、成長する細胞（主として脳毛細血管内皮細胞、若干の周皮細胞）を37℃で10%CO<sub>2</sub>下で培養した。

インビトロ血液脳関門モデルは、I V型コラーゲン被覆 Transwell ポリカーボネートフィルター（表面積0.33 cm<sup>2</sup>；孔径0.4  $\mu$ m；Corning Costar, Cambridge, MA, USA）上に調製した。約70%コンフルント（脳毛細血管の播種の4又は5日後）の時点で、脳毛細血管内皮細胞をトリプシン-EDTAで約1分間処理し、周皮細胞は下層に付着させたままにした。アストロサイトを45,000細胞/フィルターの密度でフィルターの底に播種することによって、脳毛細血管内皮細胞およびアストロサイトの共培養物を調製した。アストロサイトをフィルターの底に10分間接着させ、その2又は3日後に脳毛細血管内皮細胞を継代した。脳毛細血管内皮細胞は30,000細胞/フィルターの密度で播種した。脳毛細血管内皮細胞とアストロサイトの共培養物を、最初の2又は3日間は125  $\mu$ g/mlのヘパリンを補充したDMEM+Sで、そして最後の2又は3日間はDMEM+S又は分化培地（即ち、5  $\mu$ g/mlのアポトランスフェリン、8  $\mu$ g/mlのブトレッシン、2.5  $\mu$ g/mlの亜セレン酸ナトリウム、312.5  $\mu$ Mの8-（4-クロロフェニルチオ（CPT））-cAMP、17.5  $\mu$ MのRO-20-1724、及び1  $\mu$ Mの全トランス型レチノイン酸を補充したDMEM+S）で緊密な単層になるまで培養した。脳毛細血管内皮細胞の単層も同様に培養したが、50%（v/v）アストロサイト馴化培地を培地に添加した。

作製した共培養モデルの概要を図1の左図に示す。作製した共培養モデルにおけるフルオレッセインナトリウム拡散速度とTEER（Transcellular endothelial electrical resistance）との相関を図1の右図に示す。TEERはミリポア社ミリセル-ERS（カタログ番号：MERS00001）で測定した。

## （2）TEERに対するTNF $\alpha$ およびIL1 $\beta$ の影響

上記の血液脳関門共培養モデルを用いて、細胞に、 $\text{TNF}\alpha$  ( $50 \text{ ng/mL}$ ) および／または  $\text{IL}-1\beta$  ( $5 \text{ ng/mL}$ ) を加え、透過性を  $\text{TEER}$  としてミリポア社ミリセル-ERS (カタログ番号: MERS00001) で測定した。 $\text{TNF}\alpha$  および  $\text{IL}-1\beta$  は Transwell™ フィルターの BBB 共培養モデルの基底外側に添加した。結果 ( $n=3$ 、平均 $\pm$ SEM、\* $P<0.05$ ) を図 2 に示す。図 2 の結果から分かるように、 $\text{TNF}\alpha$  ( $50 \text{ ng/mL}$ ) および／または  $\text{IL}1\beta$  ( $5 \text{ ng/mL}$ ) を加えることにより、 $\text{TEER}$  は有意に減少した。

(3)  $\text{NF}-\kappa\text{B}$  阻害薬、 $\text{iNOS}$  阻害薬及びエダラボンによる  $\text{TEER}$  減少からの回復

細胞に、 $\text{NF}-\kappa\text{B}$  阻害薬である BAY11-7082 (CALBIOCHEM 社) ( $10 \mu\text{M}$ ) 又は  $\alpha\text{-MSH}$  (Sigma 社) ( $1 \mu\text{M}$ )、 $\text{iNOS}$  阻害薬である 1400W (CALBIOCHEM 社) ( $0.5 \text{ nM}$ ) 又はエダラボン ( $10 \mu\text{M}$ ) の存在下において、 $\text{TNF}\alpha$  ( $50 \text{ ng/mL}$ ) および／または  $\text{IL}1\beta$  ( $5 \text{ ng/mL}$ ) を加え、透過性を  $\text{TEER}$  としてミリポア社ミリセル-ERS (カタログ番号: MERS00001) で測定した。また、培養液中の  $\text{NO}$  をグリース法で測定した。

結果 (各実験について、 $n=3$ 、平均 $\pm$ SEM、\* $P<0.05$ ) を図 3 から図 5 に示す。図 3 は、 $\text{TEER}$  に対する  $\text{NF}-\kappa\text{B}$  阻害薬および  $\text{iNOS}$  阻害薬の効果を示す。図 4 は、 $\text{NO}$  産生量に対する  $\text{NF}-\kappa\text{B}$  阻害薬および  $\text{iNOS}$  阻害薬の効果を示す。図 5 は、 $\text{TEER}$  に対するエダラボンの効果を示す。図 3～図 5 の結果から分かるように、 $\text{NF}-\kappa\text{B}$  阻害薬、 $\text{iNOS}$  阻害薬又はエダラボンを添加することにより、 $\text{TNF}\alpha$  または  $\text{IL}1\beta$  による  $\text{TEER}$  減少を回復させることができた。

実施例 2 : 実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) モデルを用いたエダラボンの血液脳関門破綻抑制作用の評価

EAE (実験的自己免疫性脳脊髄炎) モデルラットを既存の方法に従い作製した (Int. J. immunopharmacol, 7:497-503, 1995)。まず、等量のモルモット脊髄、無菌リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 及び不完全フロイントアジュバンドから成

る脳炎誘発性エマルジョンを調製し、 $10\text{ mg/ml}$ の *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Ra (Difco Laboratories) を補充した。これを、各ラット（近交系雄 Lewis ラット、体重  $200\sim 250\text{ g}$ ）の両後肢足趾に皮下投与により  $0.1\text{ ml}$  ずつ接種することにより、EAEモデルラットを作製した。対照ラットには、脊髄なしのエマルジョンを接種した。

対照ラットおよびEAEモデルラットについてエダラボンを投与した場合と投与しない場合について、血漿および髄液中のTNF $\alpha$ 及びIL-1Bの濃度、髄液／血漿タンパク質比、並びに血液脳関門透過性（20分目におけるフルオレセインナトリウム静注の脳／血漿濃度（ $K_{p, app}$ ）を測定した。 $K_{p, app}$ はapparent distribution ratioを示し、フルオレセイン静脈内投与後の脳組織中濃度を血漿中濃度で割った値（ $\times 100$ により％表示）である。なお、脳組織の比重は1として換算している（濃度の単位が/g組織重量のため）。エダラボンの投与量は $3\text{ mg/kg/day}$ （腹腔内投与）とし、感作（抗原溶液の投与）10日後から24時間おきに3日間（＝感作10日後、11日後、12日後の3回）投与した。結果（各実験について、 $n=3$ 、平均 $\pm$ SEM、\* $P<0.05$ ）を図6および図7に示す。

図6および図7の結果から分かるように、EAEモデルラットでは対照ラットと比較して、髄液中のTNF $\alpha$ 及びIL-1Bの濃度が上昇し、髄液／血漿タンパク質比が上昇し、また血液脳関門透過性（フルオレセインナトリウム静注脳／血漿濃度）も上昇した。しかし、図7の結果から分かるように、これらの作用は、エダラボンの投与により抑制されることが実証された。

また、EAEモデルラットにおいて薬剤を投与しない群（コントロール）、デキサメタゾン（ $1\text{ mg/kg/day}$ 、腹腔内投与）を投与した群、及びエダラボン（ $3\text{ mg/kg/day}$ 、腹腔内投与）を投与した群について、肢神経麻痺スコアを評価した。肢神経麻痺スコアは、以下の基準で評価した。

表 1 : E A E ラットにおける Paul の臨床スコア

スコア	神経症状
0	正常
1	尾のたるみ及び歩行運動失調
2	後肢の部分的麻痺
3	失禁を伴う後肢の完全な麻痺
4	肢の完全な麻痺

評価の結果（各実験について、 $n = 3$ 、平均 $\pm$ SEM、 $*P < 0.05$ ）を図 8 に示す。図 8 の結果から分かるように、E A E モデルラットにおける肢神経麻痺スコアは、エダラボンの投与によりデキサメタゾンの投与の場合と同様に回復した。

上記した実施例 1 および実施例 2 の結果から、エダラボンは血液脳関門システムを保護して、多発性硬化症モデルでの神経症状を保護できることが実証された。

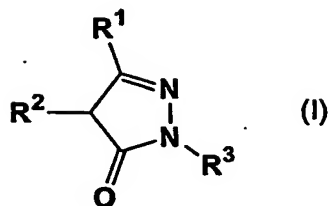
#### 産業上の利用可能性

本発明の薬剤は、中枢神経系の炎症性疾患における血液脳関門破綻を抑制するために有用である。

本出願が主張する優先権の基礎となる出願である特願 2003-004813 の明細書に記載の内容は全て、本明細書の開示の一部として本明細書中に引用により取り込むものとする。

## 請求の範囲

## 1. 下記式 (I) :



(式中、 $R^1$ は、水素原子、アリール基、炭素数1～5のアルキル基又は総炭素数3～6のアルコキシカルボニルアルキル基を表し； $R^2$ は、水素原子、アリールオキシ基、アリールメルカプト基、炭素数1～5のアルキル基又は炭素数1～3のヒドロキシアルキル基を表し；あるいは、 $R^1$ 及び $R^2$ は、共同して炭素数3～5のアルキレン基を表し； $R^3$ は、水素原子、炭素数1～5のアルキル基、炭素数5～7のシクロアルキル基、炭素数1～3のヒドロキシアルキル基、ベンジル基、ナフチル基、フェニル基、又は炭素数1～5のアルキル基、炭素数1～5のアルコキシ基、炭素数1～3のヒドロキシアルキル基、総炭素数2～5のアルコキシカルボニル基、炭素数1～3のアルキルメルカプト基、炭素数1～4のアルキルアミノ基、総炭素数2～8のジアルキルアミノ基、ハロゲン原子、トリフルオロメチル基、カルボキシル基、シアノ基、水酸基、ニトロ基、アミノ基及びアセトアミド基からなる群から選ばれる同一若しくは異なる1～3個の置換基で置換されたフェニル基を表す。)

で示されるピラゾロン誘導体若しくはその生理学的に許容される塩、又はそれらの水和物若しくは溶媒和物を有効成分として含む、血液脳関門破綻抑制剤。

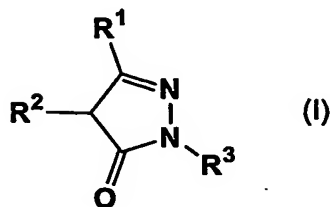
2. 血液脳関門の透過性の増大を抑制する作用を有する、請求項1に記載の血液脳関門破綻抑制剤。

3. 髄液中における炎症性サイトカインの量の増大を抑制する作用を有する、請求項1又は2に記載の血液脳関門破綻抑制剤。

4. 式 (I) で示されるピラゾロン誘導体が3-メチルー1-フェニルー2-ピラゾリン-5-オンである、請求項1から3の何れかに記載の血液脳関門破

錠抑制剤。

5. 下記式 (I) :

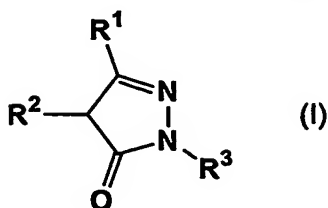


(式中、R<sup>1</sup>は、水素原子、アリール基、炭素数1～5のアルキル基又は総炭素数3～6のアルコキシカルボニルアルキル基を表し；R<sup>2</sup>は、水素原子、アリールオキシ基、アリールメルカプト基、炭素数1～5のアルキル基又は炭素数1～3のヒドロキシアルキル基を表し；あるいは、R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>は、共同して炭素数3～5のアルキレン基を表し；R<sup>3</sup>は、水素原子、炭素数1～5のアルキル基、炭素数5～7のシクロアルキル基、炭素数1～3のヒドロキシアルキル基、ベンジル基、ナフチル基、フェニル基、又は炭素数1～5のアルキル基、炭素数1～5のアルコキシ基、炭素数1～3のヒドロキシアルキル基、総炭素数2～5のアルコキシカルボニル基、炭素数1～3のアルキルメルカプト基、炭素数1～4のアルキルアミノ基、総炭素数2～8のジアルキルアミノ基、ハロゲン原子、トリフルオロメチル基、カルボキシル基、シアノ基、水酸基、ニトロ基、アミノ基及びアセトアミド基からなる群から選ばれる同一若しくは異なる1～3個の置換基で置換されたフェニル基を表す。)

で示されるピラゾロン誘導体若しくはその生理学的に許容される塩、又はそれらの水和物若しくは溶媒和物を有効成分として含む、多発性硬化症、髄膜炎、脳炎又は脳腫瘍の予防及び／又は治療のための医薬。

6. 式 (I) で示されるピラゾロン誘導体が3-メチルー1-フェニルー2-ピラゾリン-5-オンである、請求項5に記載の医薬。

7. 下記式 (I) :



(式中、 $R^1$ は、水素原子、アリール基、炭素数1～5のアルキル基又は総炭素数3～6のアルコキシカルボニルアルキル基を表し； $R^2$ は、水素原子、アリーロキシ基、アリールメルカプト基、炭素数1～5のアルキル基又は炭素数1～3のヒドロキシアルキル基を表し；あるいは、 $R^1$ 及び $R^2$ は、共同して炭素数3～5のアルキレン基を表し； $R^3$ は、水素原子、炭素数1～5のアルキル基、炭素数5～7のシクロアルキル基、炭素数1～3のヒドロキシアルキル基、ベンジル基、ナフチル基、フェニル基、又は炭素数1～5のアルキル基、炭素数1～5のアルコキシ基、炭素数1～3のヒドロキシアルキル基、総炭素数2～5のアルコキシカルボニル基、炭素数1～3のアルキルメルカプト基、炭素数1～4のアルキルアミノ基、総炭素数2～8のジアルキルアミノ基、ハロゲン原子、トリフルオロメチル基、カルボキシ基、シアノ基、水酸基、ニトロ基、アミノ基及びアセトアミド基からなる群から選ばれる同一若しくは異なる1～3個の置換基で置換されたフェニル基を表す。)

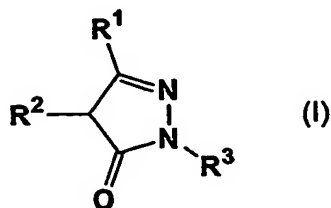
で示されるピラゾロン誘導体若しくはその生理学的に許容される塩、又はそれらの水和物若しくは溶媒和物の有効量をヒトを含む哺乳動物に投与する工程を含む、血液脳関門破綻を抑制する方法。

8. 血液脳関門の透過性の増大を抑制することにより血液脳関門破綻を抑制する、請求項7記載の方法。

9. 髄液中における炎症性サイトカインの量の増大を抑制することにより血液脳関門破綻を抑制する、請求項7又は8に記載の方法。

10. 式(I)で示されるピラゾロン誘導体が3-メチルー1-フェニルー2-ピラゾリン-5-オンである、請求項7から9の何れかに記載の方法。

11. 下記式(I)：

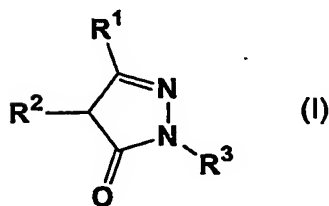


(式中、R<sup>1</sup>は、水素原子、アリール基、炭素数1～5のアルキル基又は総炭素数3～6のアルコキシカルボニルアルキル基を表し；R<sup>2</sup>は、水素原子、アリールオキシ基、アリールメルカプト基、炭素数1～5のアルキル基又は炭素数1～3のヒドロキシアルキル基を表し；あるいは、R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>は、共同して炭素数3～5のアルキレン基を表し；R<sup>3</sup>は、水素原子、炭素数1～5のアルキル基、炭素数5～7のシクロアルキル基、炭素数1～3のヒドロキシアルキル基、ベンジル基、ナフチル基、フェニル基、又は炭素数1～5のアルキル基、炭素数1～5のアルコキシ基、炭素数1～3のヒドロキシアルキル基、総炭素数2～5のアルコキシカルボニル基、炭素数1～3のアルキルメルカプト基、炭素数1～4のアルキルアミノ基、総炭素数2～8のジアルキルアミノ基、ハロゲン原子、トリフルオロメチル基、カルボキシ基、シアノ基、水酸基、ニトロ基、アミノ基及びアセトアミド基からなる群から選ばれる同一若しくは異なる1～3個の置換基で置換されたフェニル基を表す。)

で示されるピラゾロン誘導体若しくはその生理学的に許容される塩、又はそれらの水和物若しくは溶媒和物の有効量をヒトを含む哺乳動物に投与する工程を含む、多発性硬化症、髄膜炎、脳炎又は脳腫瘍を予防及び／又は治療する方法。

12. 式(I)で示されるピラゾロン誘導体が3-メチルー1-フェニルー2-ピラゾリン-5-オンである、請求項11に記載の方法。

13. 血液脳関門破綻抑制剤の製造のための、下記式(I)：



(式中、R<sup>1</sup>は、水素原子、アリール基、炭素数1～5のアルキル基又は総炭素



数 3～6 のアルコキシカルボニルアルキル基を表し； $R^2$ は、水素原子、アリー  
ルオキシ基、アリールメルカプト基、炭素数 1～5 のアルキル基又は炭素数 1～  
3 のヒドロキシアルキル基を表し；あるいは、 $R^1$ 及び $R^2$ は、共同して炭素数 3  
～5 のアルキレン基を表し； $R^3$ は、水素原子、炭素数 1～5 のアルキル基、炭  
素数 5～7 のシクロアルキル基、炭素数 1～3 のヒドロキシアルキル基、ベンジ  
ル基、ナフチル基、フェニル基、又は炭素数 1～5 のアルキル基、炭素数 1～5  
のアルコキシ基、炭素数 1～3 のヒドロキシアルキル基、総炭素数 2～5 のアル  
コキシカルボニル基、炭素数 1～3 のアルキルメルカプト基、炭素数 1～4 のア  
ルキルアミノ基、総炭素数 2～8 のジアルキルアミノ基、ハロゲン原子、トリフ  
ルオロメチル基、カルボキシル基、シアノ基、水酸基、ニトロ基、アミノ基及び  
アセトアミド基からなる群から選ばれる同一若しくは異なる 1～3 個の置換基で  
置換されたフェニル基を表す。)

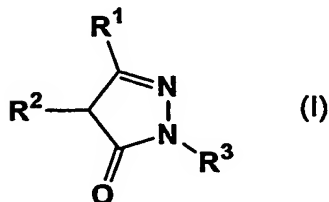
で示されるピラゾロン誘導体若しくはその生理学的に許容される塩、又はそれら  
の水和物若しくは溶媒和物の使用。

14. 血液脳関門破綻抑制剤が、血液脳関門の透過性の増大を抑制する作用  
を有するものである、請求項 13 に記載の使用。

15. 血液脳関門破綻抑制剤が、髄液中における炎症性サイトカインの量の  
増大を抑制する作用を有するものである、請求項 13 又は 14 に記載の使用。

16. 式 (I) で示されるピラゾロン誘導体が 3-メチルー 1-フェニルー  
2-ピラゾリン-5-オンである、請求項 13 から 15 の何れかに記載の使用。

17. 多発性硬化症、髄膜炎、脳炎又は脳膿瘍の予防及び／又は治療のため  
の医薬の製造のための、下記式 (I)：



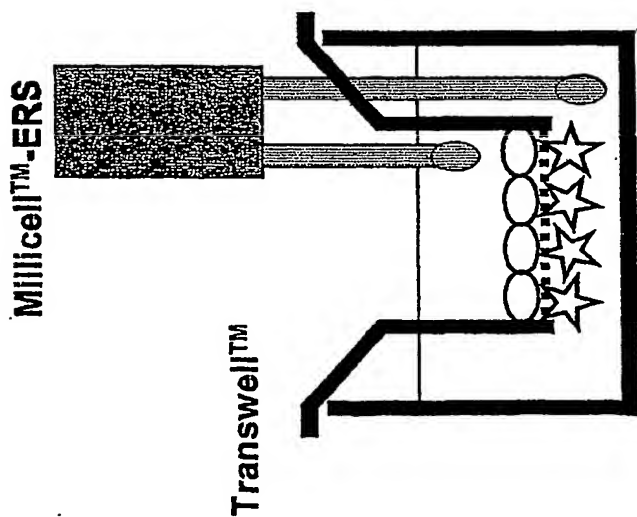
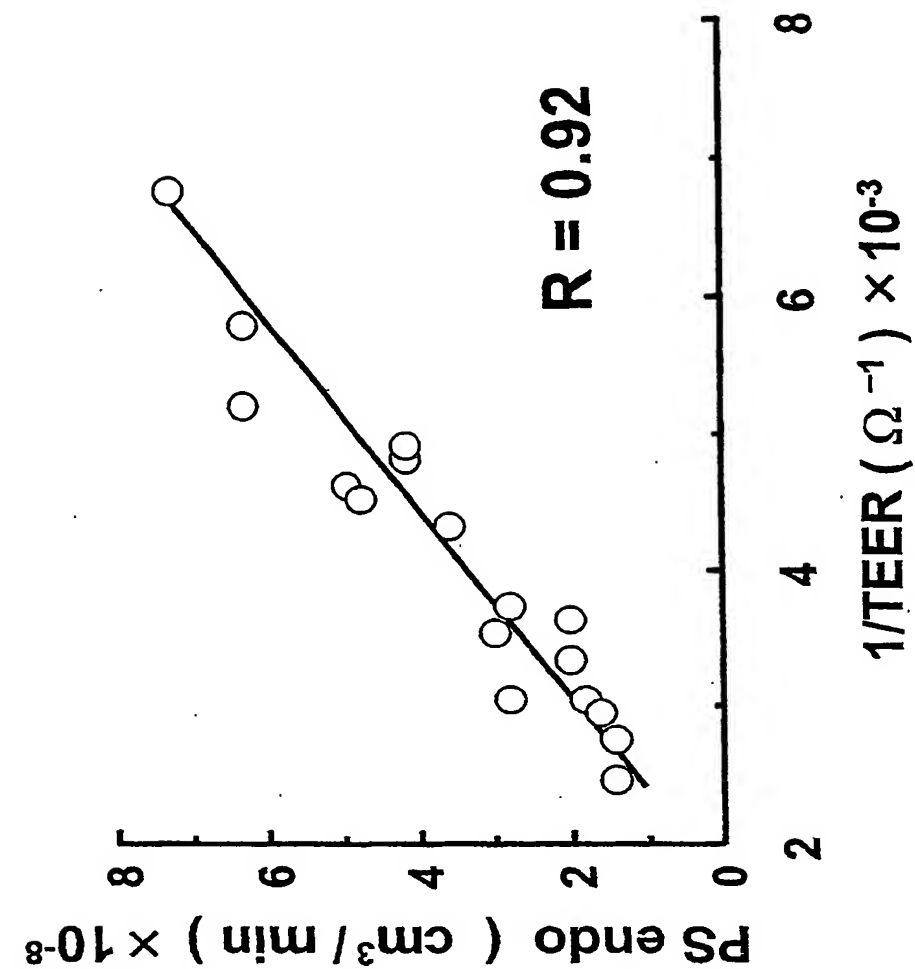
(式中、 $R^1$ は、水素原子、アリール基、炭素数 1～5 のアルキル基又は総炭素  
数 3～6 のアルコキシカルボニルアルキル基を表し； $R^2$ は、水素原子、アリー

ルオキシ基、アリールメルカプト基、炭素数1～5のアルキル基又は炭素数1～3のヒドロキシアルキル基を表し；あるいは、 $R^1$ 及び $R^2$ は、共同して炭素数3～5のアルキレン基を表し； $R^3$ は、水素原子、炭素数1～5のアルキル基、炭素数5～7のシクロアルキル基、炭素数1～3のヒドロキシアルキル基、ベンジル基、ナフチル基、フェニル基、又は炭素数1～5のアルキル基、炭素数1～5のアルコキシ基、炭素数1～3のヒドロキシアルキル基、総炭素数2～5のアルコキシカルボニル基、炭素数1～3のアルキルメルカプト基、炭素数1～4のアルキルアミノ基、総炭素数2～8のジアルキルアミノ基、ハロゲン原子、トリフルオロメチル基、カルボキシル基、シアノ基、水酸基、ニトロ基、アミノ基及びアセトアミド基からなる群から選ばれる同一若しくは異なる1～3個の置換基で置換されたフェニル基を表す。）

で示されるピラゾロン誘導体若しくはその生理学的に許容される塩、又はそれらの水和物若しくは溶媒和物の使用。

18. 式(I)で示されるピラゾロン誘導体が3-メチルー1-フェニルー2-ピラゾリン-5-オンである、請求項17に記載の使用。

図 1



共培養物の性質

○ : ウシ脳毛細血管内皮細胞

☆ : ラットアストロサイト

図 2

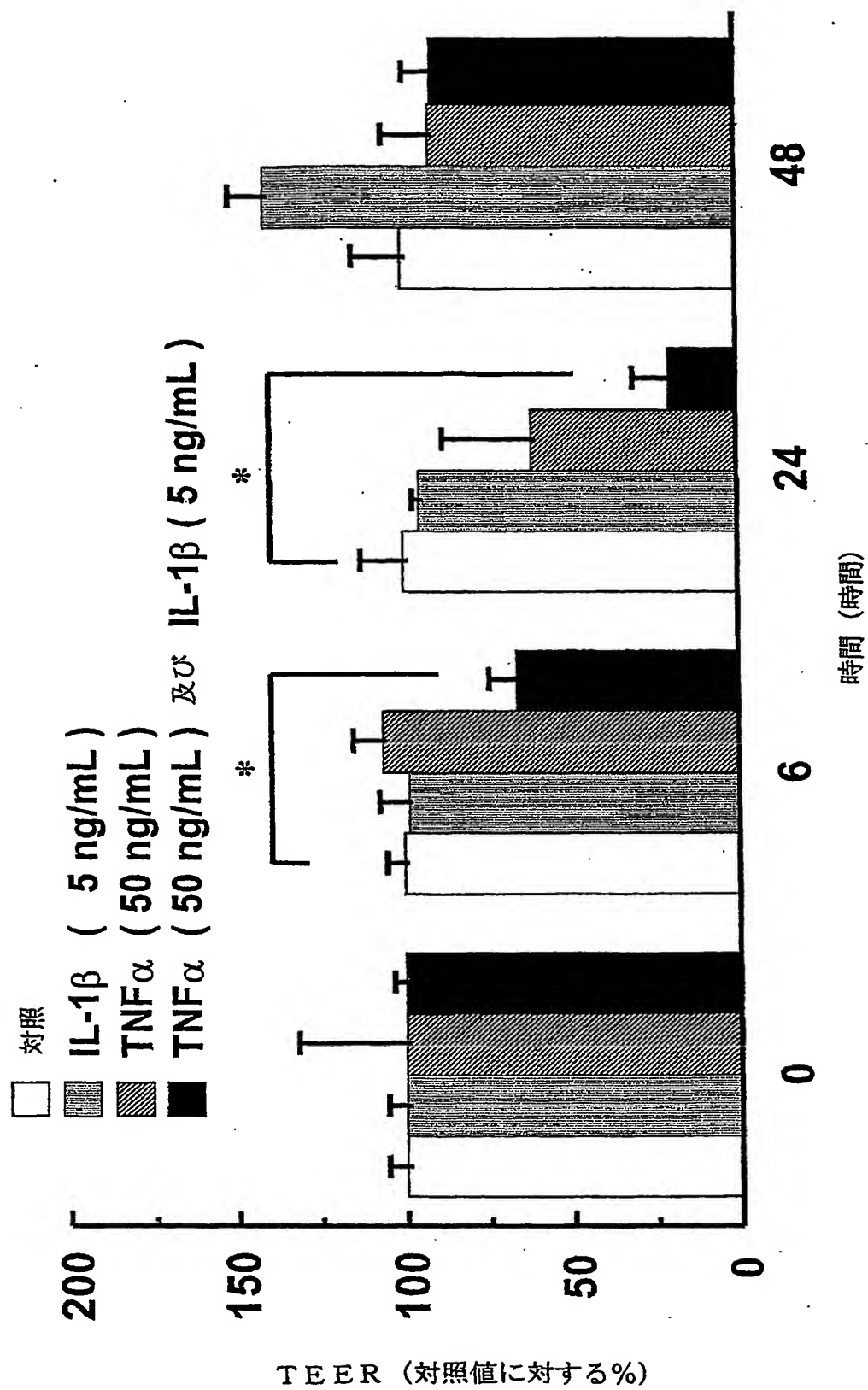


図 3

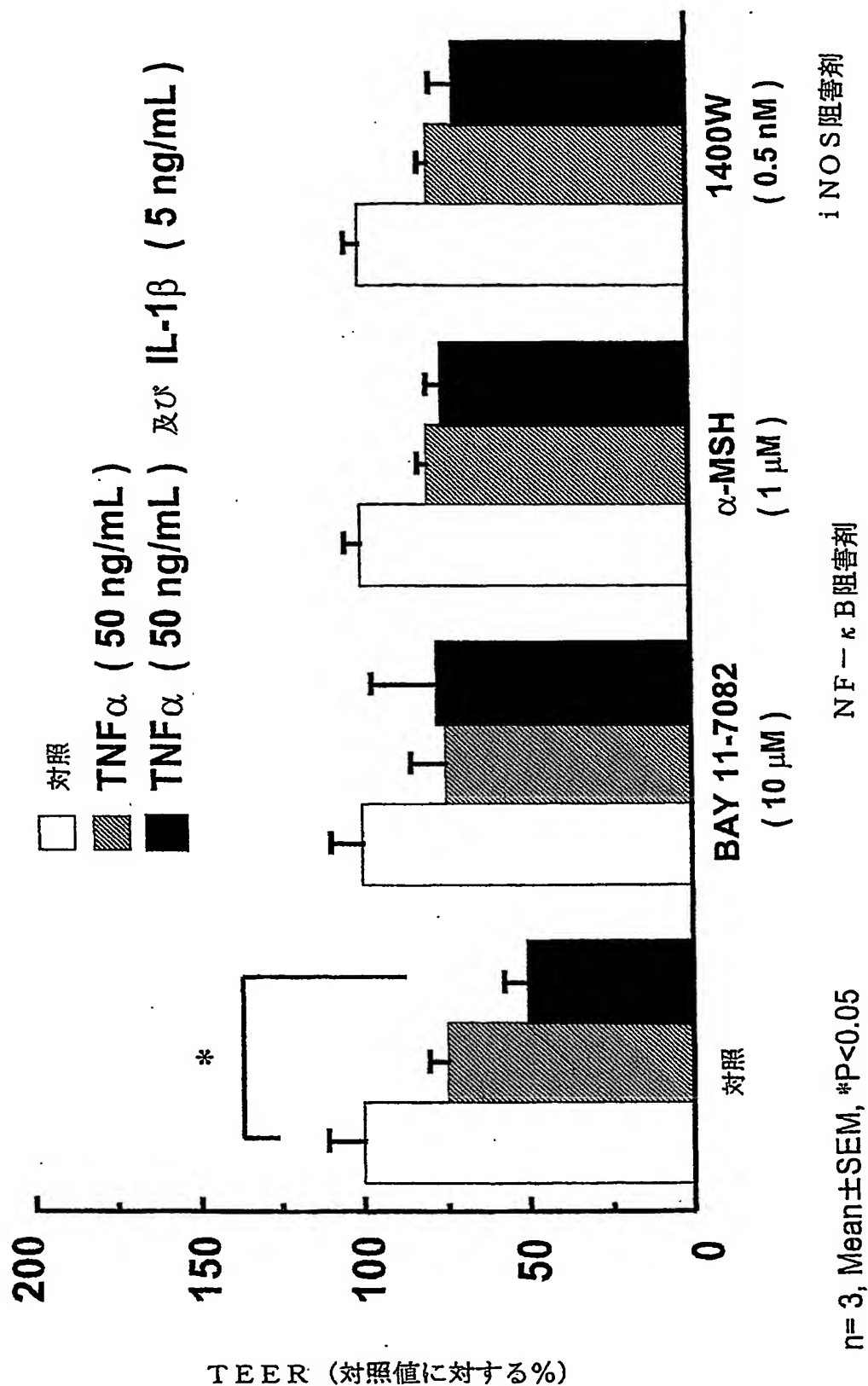


図 4

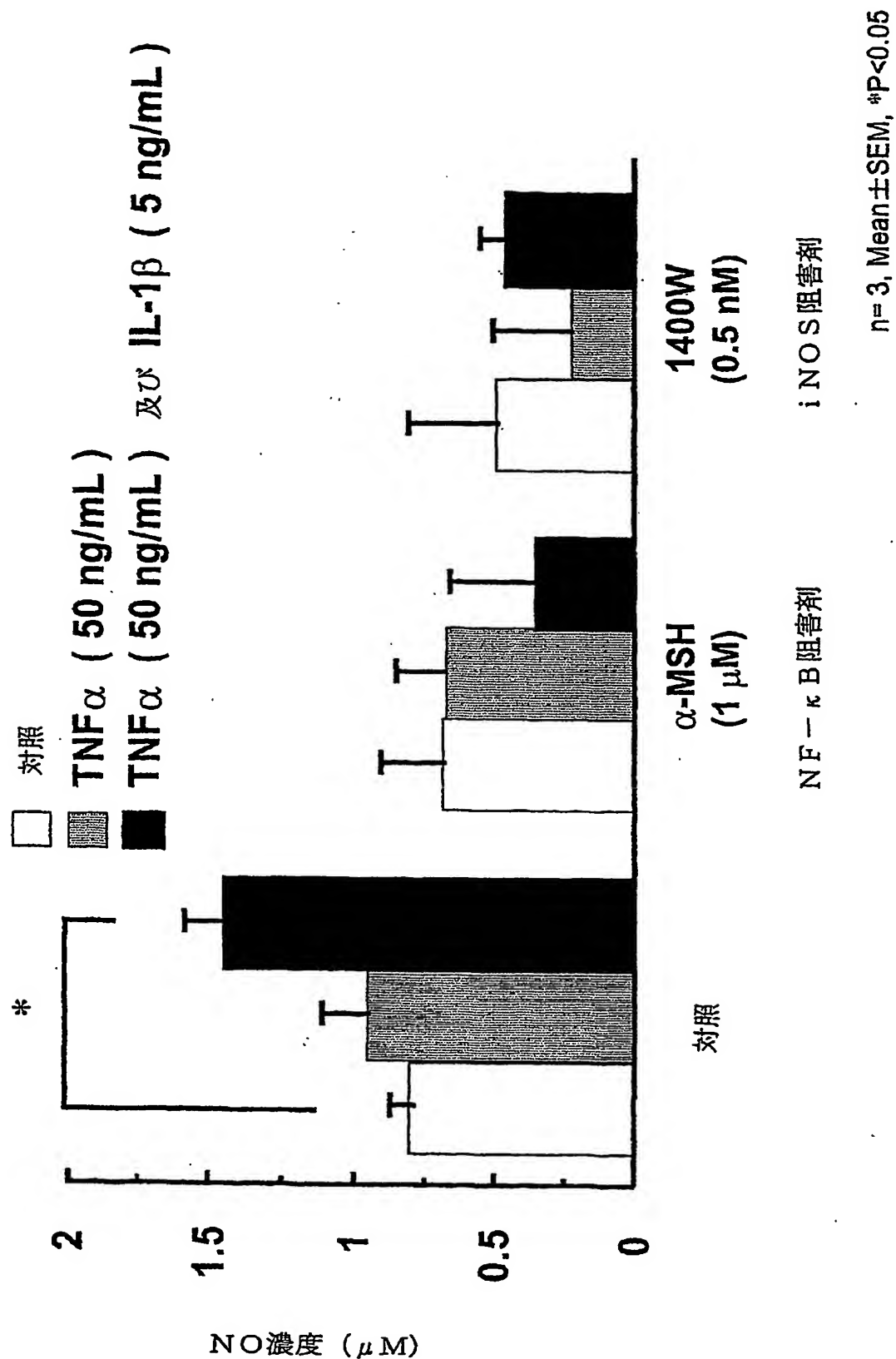


図 5

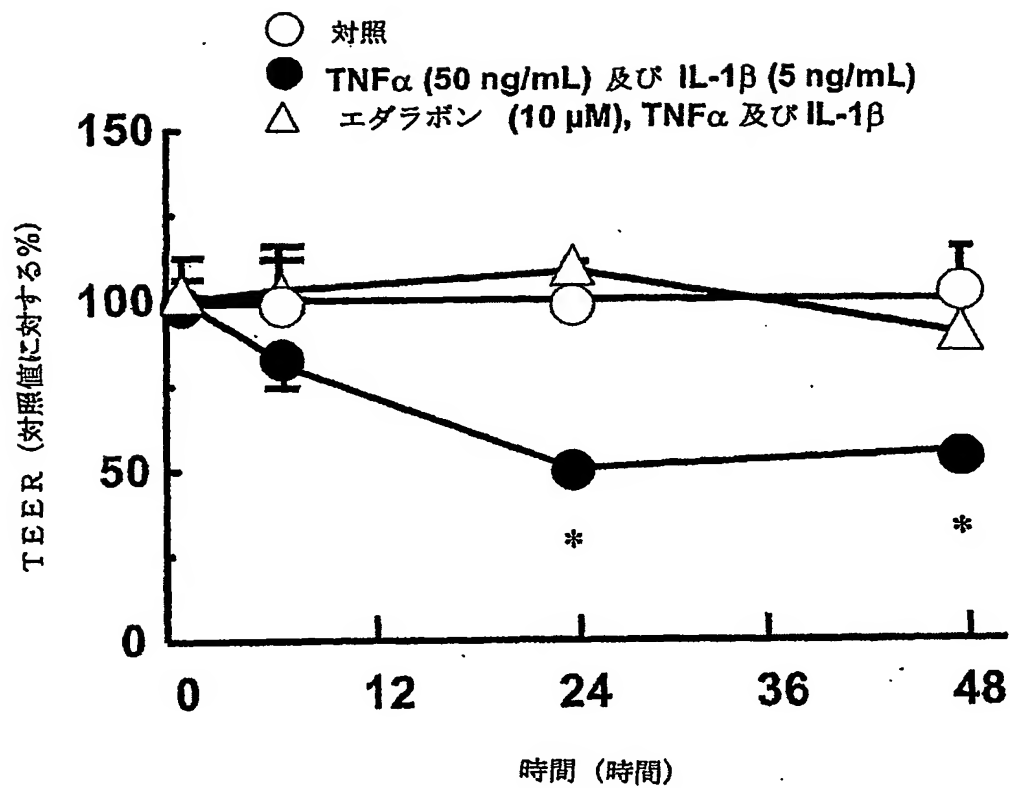
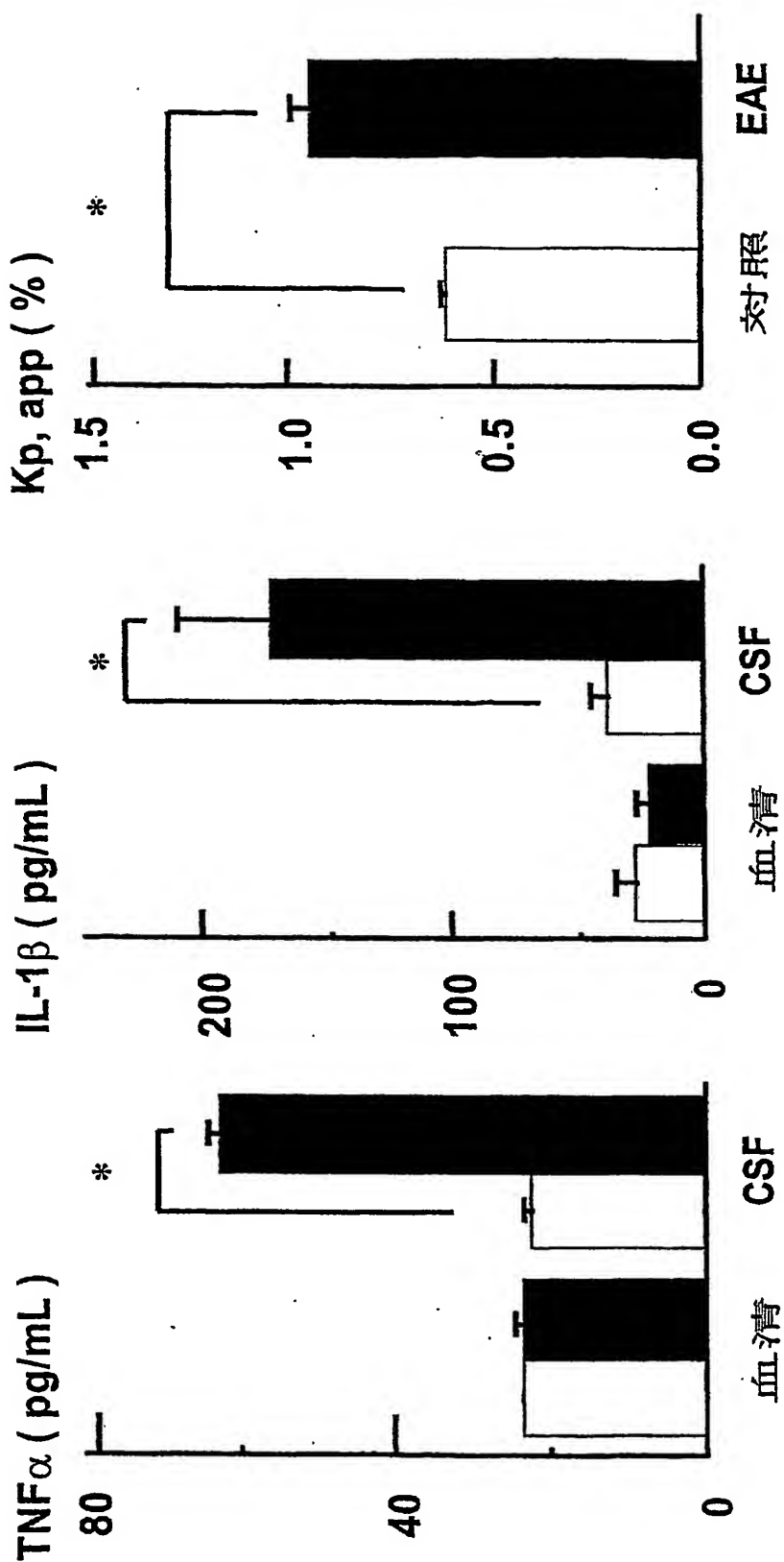


図 6

□ 対照 ■ EAE

(A) 炎症性サイトカイン

(B) BBB透過性

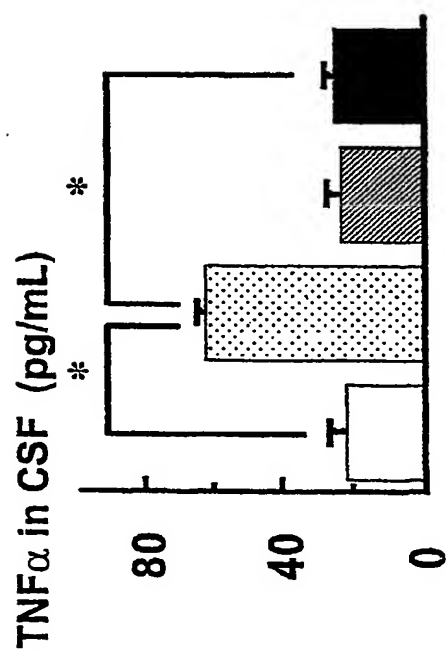


n=3, Mean ± SEM, \*P<0.05

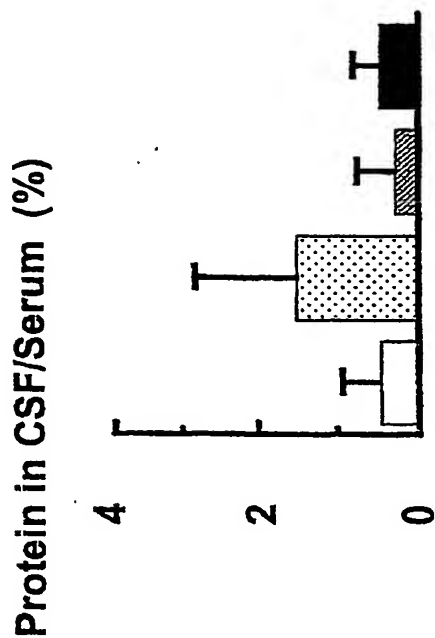


図 7

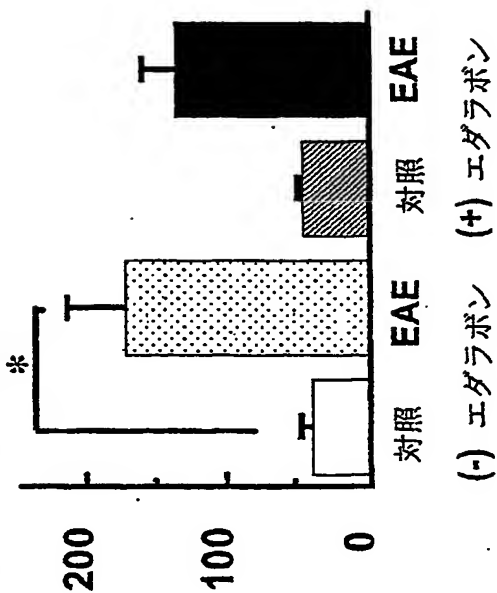
(A) 炎症性サイトカイン



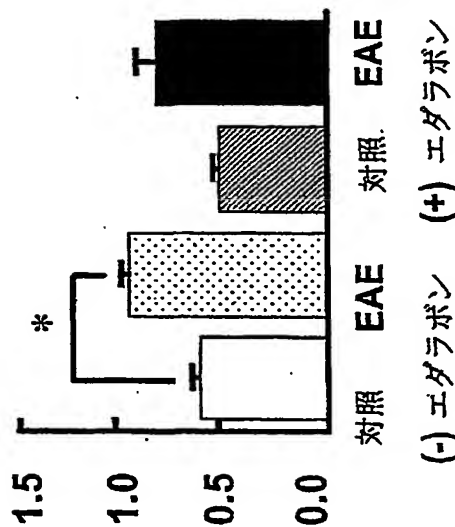
(B) BBB透過性



**IL-1 $\beta$  in CSF (pg/mL)**



**Kp, app (%)**

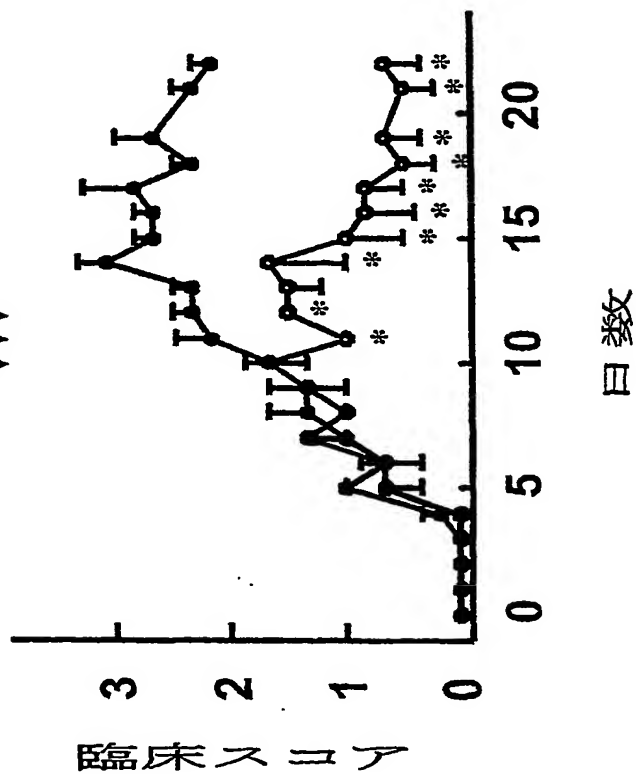


n=3, Mean $\pm$ SEM, \*p<0.05

図 8

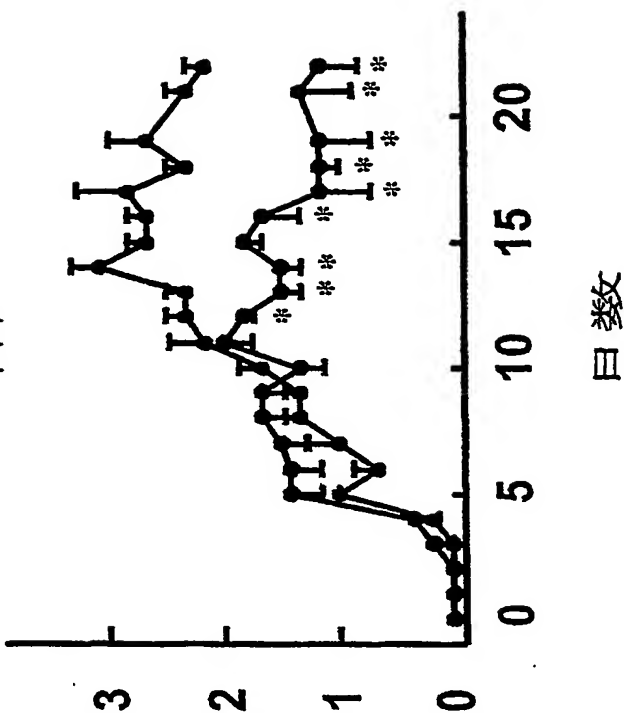
(A) デキサメタゾン

(1 mg/kg/day, i.p.)



(B) エタラボン

(3 mg/kg/day, i.p.)



n=3, Mean±SD, \*P<0.05

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP2004/000105

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>7</sup> C07D231/26, A61K31/4152, A61P7/00, 9/00, 25/00, 29/00,  
35/00, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>7</sup> C07D231/26, A61K31/4152, A61P7/00, 9/00, 25/00, 29/00,  
35/00, 43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
JOIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WATANABE, T. et al., "Protective Effects of MCI-186 on Cerebral Ischemia: Possible Involvement of Free Radical Scavenging and Antioxidant Actions", The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 268(3), p.1597-604 (1994), ABSTRACT; Fig. 3, page 1600, left column, lines 3 to 12	1-2, 4, 13-14, 16
Y		3, 5-6, 15, 17-18
Y		3, 5-6, 15, 17-18
	HAUSER, S.L. et al., "Cytokine accumulations in CSF of multiple sclerosis patients: Frequent detection of interleukin-1 and tumor necrosis factor but not interleukin-6", Neurology 40, pages 1735 to 1739 (1990)	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
24 February, 2004 (24.02.04)

Date of mailing of the international search report  
09 March, 2004 (09.03.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Internal application No.

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1998)

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP2004/000105

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 7 to 12

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The inventions as set forth in these claims are relevant to methods for treatment of the human body by therapy.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C07D231/26, A61K31/4152, A61P7/00, 9/00, 25/00,  
29/00, 35/00, 43/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C07D231/26, A61K31/4152, A61P7/00, 9/00, 25/00,  
29/00, 35/00, 43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
JOIS

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WATANABE, T., 他, "Protective Effects of MCI-186 on Cerebral Ischemia: Possible Involvement of Free Radical Scavenging and Antioxidant Actions", The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 268(3) pp1597-604 (1994) ABSTRACT、第3図、第1600頁左欄第3行~第12行参照	1-2, 4, 13-14, 16
Y		3, 5-6, 15, 17-18

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

24. 02. 2004

国際調査報告の発送日

09. 3. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

守安 智

4C

8519

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	HAUSER, S. L., 他, "Cytokine accumulations in CSF of multiple sclerosis patients: Frequent detection of interleukin-1 and tumor necrosis factor but not interleukin-6", Neurology 40 pp1735-1739 (1990)	3, 5-6, 15, 17-18
A	EP 208874 A1 (MITSUBISHI KASEI CORPORATION) 1987.01.21 & DK 227186 A & JP 62-108814 A & US 4857542 A & US 35801 E	1-6, 13-18

## 第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 7-12 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、  
ヒトの治療方法に係る発明が記載されている。
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☒ **FADED TEXT OR DRAWING**

☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**